

学校编码：10384

学号：200225025

分类号_____密级_____

UDC_____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

高效毛细管电泳技术
及其在中药有效成分分析中的应用

沈 阳

指导教师姓名：王小如 教授

专 业 名 称：分析化学

论文提交日期：2005 年 5 月

论文答辩时间：2005 年 6 月

学位授予日期：

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2005 年 6 月

**RESEARCH AND APPLICATION ON
TRADITIONAL CHINESE MEDICINES OF HIGH
PERFORMANCE CAPILLARY
ELECTROPHORESIS**

A Dissertation Presented

By

Yang SHEN

Supervisor:

Professor & Ph. D : Xiaoru WANG

**Submitted to the Graduate School of Xiamen University
for the Degree of MASTER in SCIENCE**

June, 2005

Department of Chemistry, Xiamen University

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文,是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果,均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人(签名):

年 月 日

目 录

摘要	
Abstract	
缩略语表	
 第一章 前言	1
第一节 毛细管电泳技术概述	1
1.1 发展历史简述	1
1.2 基本原理	1
1.3 仪器简介	6
1.3.1 基本结构	6
1.3.2 进样系统	7
1.3.3 毛细管电泳仪检测器	8
第二节 毛细管电泳在中药有效成分分析中的应用	9
2.1 应用概述	9
2.2 在中药有效成分分析的应用	10
第三节 本工作的研究目的、意义及主要内容	25
参考文献	26
 第二章 甘草药材的毛细管电泳研究	40
第一节 毛细管区带电泳法分离测定甘草酸	43
1.1 实验部分	43
1.2 结果与讨论	45
1.2.1 提取方法	45
1.2.2 检测波长选择	46
1.2.3 内标物质选择	47

1.2.4 精密度与方法重现性	48
1.2.5 定量分析	48
1.2.5.1 工作曲线	48
1.2.5.2 甘草不同部位甘草酸含量分析	49
1.2.5.3 不同产地甘草中甘草酸含量分析	50
1.2.6 不同种类甘草药材毛细管电泳指纹图谱研究	51
1.2.7 甘草药材 HPCE 与 HPLC 分析比较	53
第二节 胶束电动毛细管色谱法研究甘草药材指纹图谱	58
2.1 实验方法与数据处理	58
2.2 结果与讨论	59
2.2.1 正交实验法优化电泳参数	59
2.2.2 不同种类甘草药材毛细管电泳指纹图谱研究	63
2.2.2.1 梁地甘草电泳指纹图谱	63
2.2.2.2 滩地甘草电泳指纹图谱	65
2.2.2.3 沙地甘草电泳指纹图谱	67
2.2.3 不同地区甘草药材毛细管电泳指纹图谱动态跟踪分析	68
2.2.3.1 陈红西湾甘草样品动态跟踪分析	69
2.2.3.2 上海庙甘草样品动态跟踪分析	71
2.2.3.3 康美基地甘草样品动态跟踪分析	73
2.3 结论	75
参考文献	76
第三章 泽泻药材的毛细管电泳研究	81
第一节 泽泻药材胶束电动毛细管色谱法研究	83
1.1 实验部分	83
1.2 方法与结果	84
1.2.1 毛细管电泳分离条件的选择	84
1.2.2 最佳条件确定	86

1.2.3 重复性试验	89
1.3 结论	89
第二节 微乳液毛细管电动色谱法分离泽泻药材中的 23-乙酰泽泻醇 B 和 24-乙酰泽泻醇 A	
2.1 实验部分	92
2.2 结果与讨论	94
2.2.1 pH 值对分离结果的影响	94
2.2.2 SDS 浓度对分离的影响	94
2.2.3 正丁醇对分离的影响	94
2.2.4 硼酸钠浓度对分离的影响	95
2.2.5 有机溶剂对分离的影响	95
2.2.6 MEEKC 重现性	95
2.3 结论	96
参考文献	97
附录 在学期间发表的论文	104
致谢	105

摘 要

本论文工作以中药甘草和泽泻为研究对象,探索了高效的中药有效成分的分离方法,发展了甘草有效成分的 CZE 和 MEKC 分析方法以及泽泻有效成分的 MEKC 和 MEEKC 分离分析方法。本工作为中药甘草和泽泻的物质基础研究和深度开发提供有价值的参考依据和方法,为中药有效成分的分离提供新的途径,具有重要意义。

论文主要包括两大部分,第一部分(第一章)综述了毛细管电泳技术在中药有效成分中的应用;第二部分(第二、三章)研究了毛细管电泳的三种不同模式在中药甘草、泽泻的有效成分分析中的应用,并且开创了微乳液毛细管电色谱在中药材分析中的应用。

第一章通过一百多篇的文献,概述了国内外高效毛细管电泳技术,重点介绍了该技术对中药有效成分分离、分析及应用;在此基础上,归纳了本论文研究课题的立题依据、研究目的、意义及主要内容。

第二章以中药甘草为研究对象,共分两节。在第一节中建立了甘草主要活性成分甘草酸和甘草次酸的毛细管区带电泳分离方法。将该方法用于不同产地、不同部位的甘草药材中甘草酸含量的定量分析,并验证了该方法应用于中药甘草指纹图谱研究的可行性;此外,还将该方法与 HPLC 进行了比较,结果表明 HPCE 在分析时间、分析范围等方面较 HPLC 有优势。第二节介绍了甘草的胶束电动毛细管色谱(MEKC)指纹图谱分析。首先采用正交试验法确定 MEKC 的最优参数,得到甘草药材的指纹图谱,在此基础上结合 SAS 分析软件,分析了梁地、滩地、沙地三种不同品种的甘草的相关性,并对不同产地的甘草进行了动态分析研究。

第三章以泽泻药材为分析对象,分为两节。第一节发展了泽泻药材 MEKC 分析方法。第二节,开创性地将微乳液体系用于 HPCE,发展了泽

泻药材的微乳液毛细管电色谱 (MEEKC) 分析方法。本工作将微乳液的组成对分析结果的影响进行了详尽的考察, 并且得到了较好的分析结果。

关键词: 高效毛细管电泳; 微乳液毛细管电色谱; 中药材; 甘草; 泽泻

Abstract

Identification and quantification of the true bioactive components in Chinese medicinal materials in order to establish the material basis of their therapeutic efficacy is an important part of the overall effort to modernize Traditional Chinese Medicines (TCMs). Effective methods for the separation of the active components in TCM is one of the key technologies which have to be developed in this endeavor. In this study, high performance capillary electrophoresis (HPCE) as a separation technique was the focus of our research; and two kinds of Chinese herbs—licorice, the root of *glycyrrhiza uralensis* Fisch and Rhizoma Alismatis were chosen as the target TCMs. Three different separation modes of HPCE, i.e., capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic chromatography (MEKC), and microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) were applied to the separation of their respective active compounds from licorice and Alisma orientalis.

The dissertation consists of two main parts. One is HPCE techniques (chapter 1) development, and the other is the application of HPCE to licorice and Rhizoma Alismatis (from chapter 2 to 3).

Chapter 1 gives a review of the HPCE technique outlining its principles, research status, developing trends, equipment, separation modes and applications in TCM. The purpose, significance and main contents of the dissertation are also summarized in this chapter.

In chapter 2, results from the analysis of licorice are presented in 2 sections. In the work described in Section 1, a CZE method was developed for the identification and determination of the main bio-active components, glycyrrhizinic acid (GA) and its degradation product glycyrrhetinic acid (GTA)

from the extract of licorice. Licorice samples originated from different producing areas were studied and compared. The feasibility of fingerprinting licorice for authentication and identification purposes was also discussed. Furthermore, HPCE and HPLC methods were compared for the qualitative and quantitative analysis of GA in the aqueous extracts of licorice. In Section 2, a new MEKC method was established. Several factors affecting the effectiveness of the method including operational power, contents of borate, and SDS were investigated. The optimized MEKC conditions were obtained from orthogonal tests. Under the optimum conditions, the fingerprints of licorice extracts were analyzed and compared using SAS software.

The work described in chapter 3 focused on the determination and separation of the main bio-active components including 23-acetyl alisol B and 24-acetyl alisol A in *Rhizoma Alismatis*. In the first section MEKC conditions were optimized by the orthogonal test, similar to those described in chapter 2. In the second section MEKC method was developed in a new mode, MEEKC, where micro emulsions was applied to HPCE in a creative way. Several factors such as pH value, contents of borate and SDS, volume of organic solvents were studied in detail.

Keywords: High performance capillary electrophoresis (HPCE); microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC); traditional Chinese Medicines (TCM); licorice; *Rhizoma Alismatis*.

缩略语表

HPCE	高效毛细管电泳
CZE	毛细管区带电泳
MEKC	胶束电动毛细管色谱
CGE	毛细管凝胶电泳
CIEF	毛细管等电聚焦
CITP	毛细管等速电泳
AHPCE	亲和毛细管电泳
MEEKC	微乳毛细管电色谱
SDS	十二烷基磺酸钠
CTAB	十六烷基三甲基溴化铵
CMC	临界浓度
EOF	电渗流
HGP	人类基因组计划
bp	碱基对
LIF	激光诱导荧光检测法
GC	气相色谱法
HPLC	高效液相色谱法
TLC	薄层扫描法
GA	甘草酸
GTA	甘草次酸
DAD	二极管阵列检测器
GAP	农业规范化生产
RSD	相对标准偏差

第一章 前言

第一节 毛细管电泳技术概述

1.1 电泳发展历史简述

毛细管电泳法，又称高效毛细管电泳(HPCE)，是 80 年代发展起来的一种新型高效分析技术。在 60-70 年代，Mikkers 等人曾对 HPCE 技术进行过研究^[1]，当时由于检测器的灵敏度不够，较大内径毛细管在电泳过程中产生的焦耳热不能很快散去，高电压无法运用，致使分离效率不高，影响了推广应用。80 年代，Jorgenson 等人^[2]采用高灵敏检测器、细内径毛细管、高压电场，提高了分离效率，推动了 HPCE 的研究。1989 年至 1991 年连续召开了三届国际性 HPCE 专题讨论会^[3]，使 HPCE 应用于分析化学、生物化学、生物工程领域的研究，有关毛细管柱的制备技术、检测器的研究都得到很快的发展。

1.2 HPCE 基本原理

HPCE 的基本原理：缓冲溶液中不同的带电离子或电荷粒子以电场为驱动力，在毛细管中按其淌度和分配系数不同进行高效、快速分离。

带电粒子在直流电场作用下于一定介质（溶剂）中所发生的定向运动就是电泳。单位电场下的电泳速度（ v/E ）称为淌度或电迁移率（ μ_{em} ），在无限稀释溶液中（稀释液数据外推）测得的淌度称为绝对淌度（ μ_{em}^0 ）。

实际溶液存在多种离子，由于它们的活度，特别是酸

碱性的不同，样品分子的解离度不同，电荷也将发生变化，因而所表现出的淌度会小于绝对淌度，这时的淌度可称为有效淌度，记作 μ_{eff} 。

离子所带电荷越多、解离度越大、体积越小、溶液粘度越小，电泳速度就越快。这正是电泳分离及其条件选择的根本依据之一。

电渗是毛细管中的溶剂因轴向直流电场作用而发生的定向流动。电渗起因于定域电荷。所谓定域电荷，是指牢固结合在管壁上、在电场作用下不能迁移的离子或带电基团。根据电中性要求，定域电荷将吸引溶液中的反号离子，使其聚集在自己周围，形成所谓的双电层。

固液界面形成双电层的结果是，在靠近管壁的溶液层中形成高出溶液本体的“自由”离子，它们在电泳过程中通过碰撞等作用给溶剂分子施加单向推力，使之同向运动，从而形成电渗。

在多数水溶液中，石英和玻璃毛细管表面因硅羟基解离会产生负的定域电荷，许多有机材料如聚四氟乙烯、聚苯乙烯等也会因为残留的羧基而产生负的定域电荷，其结果是产生指向负极的电渗。当把样品从正极端注入到由上述材料制

备或填充的毛细管中时,不同符号的离子将按下表的速度向负极迁移。

表 1-1 在电渗中的样品分子迁移速度

组分	合淌度	合速度
正离子	$\mu_H = \mu_{em} + \mu_{os}$	$v_H = v_{em} + v_{os}$
中性组分	$\mu_H = \mu_{os}$	$v_H = v_{os}$
负离子	$\mu_H = \mu_{os} - \mu_{em}$	$v_H = v_{os} - v_{em}$

μ_H ——合淌度； v_H ——合速度。

在毛细管电泳中，电渗速度可比电泳速度大一个数量级，所以能实现所有样品的同向泳动，这 and 传统电泳不同。分离后的出峰顺序：正离子>中性分子>负离子。注意，此时所有的中性分子与电渗同速，没有分离。

HPCE按分离介质和分离原理不同，存在多种操作模式，各种模式的分离机理是不相同的。如今的毛细管电泳不再仅仅局限于分离荷电的大分子粒子，也适合分离阳离子、阴离子以及中性分子。常见的毛细管电泳的分离模式包括毛细管区带电泳(CZE)、胶束电动毛细管色谱(MEKC)、毛细管凝胶电泳(CGE)、毛细管等电聚焦(CIEF)、毛细管等速电泳(CITP)和亲和毛细管电泳(AHPCE)等。

表 1-2 HPCE 分离模式分类

类型	缩写	说明
1.空管（自由溶液）		

毛细管区带电泳	CZE	毛细管和电极槽灌有相同缓冲液
毛细管等速电泳	CITP	使用两种不同的 CZE 缓冲液
毛细管等电聚焦	CIEF	管内装 pH 梯度介质
胶束电动毛细管色谱	MECC	在 CZE 缓冲液中加入胶束
微乳液毛细管电动色谱	MEEKC	在 CZE 缓冲液中加入水包油微乳液
高分子离子交换毛细管电动色谱	PICEC	在 CZE 缓冲液中加入可微观分相的高分子离子
开管毛细管电色谱	OTCEC	使用固定相涂层毛细管，分正、反相和离子交换
亲和毛细管电泳	ACE	在 CZE 缓冲液中加入亲和作用试剂
非胶毛细管电泳	NGCE	在 CZE 缓冲液中加入高分子构成筛分网络
2.填充管		
毛细管凝胶电泳	CGE	管内填充凝胶介质，使用 CZE 缓冲液
聚丙烯酰胺凝胶电泳	PA-CGE	管内填充聚丙烯酰胺凝胶
琼脂糖毛细管凝胶电泳	Agar-CGE	管内填充琼脂糖凝胶
填充毛细管电色谱	PCCEC	管内填充色谱填料，分正、反相和离子交换
阵列毛细管电泳	CAE	使用一根以上的毛细管
芯片式毛细管电泳	CCE	使用刻制在载玻片上的毛细通道进行电泳
3.联用		
毛细管电泳/质谱	CE/MS	常用电喷雾接口，使用挥发性缓冲液
毛细管电泳/核磁共振	CE/NMR	采用停顿式扫描样品峰
毛细管电泳/激光诱导荧光	CE/LIF	具单细胞、单分子分析潜力

一、毛细管区带电泳法 (CZE) ^[4-7]

CZE又称毛细管自由电泳，是毛细管电泳中最基本、操作最简单、应用最广泛的一种模式。在CZE中，毛细管内只充入缓冲溶液，在直流高压驱

动下，溶质以不同的速率在分立的区带内进行迁移而被分离，由于电渗流(EOF)的存在，正负离子都可用CZE分离，而中性溶质本身在电场中不移动，随EOF一起流出毛细管。CZE的应用范围很宽，包括对氨基酸、多肽、离子、对映体等物质的分析。

二、胶束电动毛细管色谱法 (MEKC) ^[4-7]

把离子型表面活性剂（如阴离子表面活性剂十二烷基磺酸钠 SDS）加到缓冲溶液中，当其浓度超过临界浓度（CMC）时，便会聚集形成一个具有疏水内核，外部带有负电的胶束。在中性和碱性情况下，电渗流（EOF）的速度大于胶束迁移速率，因此胶束实际迁移方向与 EOF 一致（指向负极）。溶质依据疏水性的不同在水相和胶束相（准固定相）之间进行多次分配，中性粒子因其疏水性不同，在两相分配中形成差异，其中疏水性强的中性粒子与胶束结合比较牢固，洗脱时间较长，最终按中性粒子的疏水性不同得以分离。MEKC 模式能够分离中性物质，从而拓宽了毛细管电泳技术的应用范围。

三、微乳毛细管电色谱 (MEEKC) ^[5-10]

其分离过程中，被分析物在微乳液滴和水相之间分配，化合物的疏水性不同，同微乳液滴的亲合作用也不同。脂溶性越强，和微乳液滴的亲合作用越强，迁移时间越长。SDS 和 CTAB 是 MEEKC 中最常用的表面活性剂。在体系中加入的表面活性剂达到某一浓度(CMC)时，会在界面上饱和，继续加入，便会在主体相中聚集成团，这时的聚团称为胶团或胶束。胶团中含另一相的量较少，有些是中空的。使胶团溶胀，或加入助表面活性剂，都能形成含有另一相微滴的聚团，这样的聚团叫作微乳。微乳体系分散相较均匀，大小为 10 ~ 200nm，呈半透明或透明状，表面张力很低，可以自

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库